

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

RICARDO H. G. KAWAGUTI

**EFEITOS DA INTENSIDADE DE TREINAMENTO
FÍSICO SOBRE A SENSIBILIDADE À INSULINA
E ATIVIDADE DA AKT NO MÚSCULO
ESQUELÉTICO DE RATOS OBESOS**

SANTOS

2009

RICARDO H. G. KAWAGUTI

**EFEITOS DA INTENSIDADE DE TREINAMENTO
FÍSICO SOBRE A SENSIBILIDADE À INSULINA
E ATIVIDADE DA AKT NO MÚSCULO
ESQUELÉTICO DE RATOS OBESOS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado
à Universidade Federal de São Paulo como
parte dos requisitos para obtenção do título
de bacharel em Educação Física –
Modalidade Saúde.

Orientador: Prof. Dr. José Rodrigo Pauli

SANTOS

2009

RICARDO H. G. KAWAGUTI

**EFEITOS DA INTENSIDADE DE TREINAMENTO
FÍSICO SOBRE A SENSIBILIDADE À INSULINA
E ATIVIDADE DA AKT NO MÚSCULO
ESQUELÉTICO DE RATOS OBESOS**

Aprovado em ___ de _____ de 2009

Prof. Dr. José Rodrigo Pauli - Orientador
Universidade Federal de São Paulo

Prof^a. Dra. Alessandra Medeiros
Universidade Federal de São Paulo

Prof^a. Dra. Ana Raimunda Dâmaso
Universidade Federal de São Paulo

SANTOS

2009

DEDICATÓRIA

A minha mãe por todo esforço, carinho,
dedicação, sabedoria e amor.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador pela confiança, empenho e ajuda nos momentos mais difíceis.

A minha mãe por tudo que me deu até hoje.

A minha família pelo suporte e exemplo.

A Dani pelo carinho e apoio nos momentos mais difíceis da faculdade.

Aos professores que de alguma forma me ensinaram muita coisa.

Aos meus amigos por tornar a minha jornada durante a faculdade mais fácil.

RESUMO

Introdução: O treinamento de endurance aumenta o transporte de glicose muscular estimulado pela insulina e levando a uma melhora no controle metabólico de pacientes com diabetes. **Objetivo:** Analisar os efeitos de duas diferentes intensidades de exercício aeróbio nos primeiros passos da ação da insulina no músculo de ratos obesos e diabéticos. **Delineamento:** Ratos machos submetidos ao treinamento de natação 5 vezes por semana durante 6 semanas foram comparados com animais do grupo controle. No final do período de treinamento, os animais foram anestesiados e receberam injeção intravenosa de insulina e tiveram um fragmento do músculo gastrocnêmio extraído para experimentos. **Métodos:** A fosforilação em serina da Akt foi detectada pelo total extraído de immunoblot. **Resultados:** A fosforilação da Akt induzida pela insulina aumentou no grupo treinado (OT-1 e OT-2) quando comparados com o grupo sedentário (OS), porém o grupo OT-2 teve aumento maior quando comparado com o grupo OT-1. Estes resultados foram acompanhados pelo aumento da resposta à insulina demonstrada pelo aumento na taxa de captação de glicose no teste de intolerância à insulina (TTI). **Conclusão:** As diferentes melhoras na responsividade à insulina induzida por duas diferentes intensidades de exercício aeróbio crônico no músculo esquelético de ratos, mostrou que o treinamento realizado com intensidade mais alta trouxe mais benefícios na modulação da via de sinalização da insulina.

PALAVRAS-CHAVE

Obesidade; Diabetes; Resistência à insulina e Exercício físico.

ABSTRACT

Background: Endurance training increases insulin-stimulated muscle glucose transport and leads to improved metabolic control in diabetic patients. **Objective:** To analyze the effects of two different intensities of endurance training on the early steps of insulin action in muscle of obese and diabetics rats. **Design:** Male rats submitted to swimming training 5 times a week and during 6 weeks were compared with sedentary controls. At the end of the training period, anesthetized animals received an intravenous (i.v.) injection of insulin and had a fragment of their gastrocnemius muscle excised for the experiments. **Methods:** Akt-1 serine phosphorylation was detected by immunoblotting of total extracts. **Results:** Insulin-induced phosphorylation of Akt increased in training group (OT-1 and OT-2) as compare with sedentary control (OS), whereas the OT-2 have a higher increase when was compare with OT-1. These findings were accompanied by increased responsiveness to insulin as demonstrated by increased glucose disappearance rate during an insulin tolerance test (ITT). **Conclusions:** The different increased responsiveness to insulin induced by two different intensities of endurance chronic exercise in rat skeletal muscle, shown that endurance exercise in higher intensity can bring more benefits in modulation of the insulin signaling pathway.

KEY-WORDS

Obesity; Diabetes; Insulin Resistance and Physical Exercise.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	01
2	REVISÃO DE LITERATURA	02
2.1	EPIDEMIOLOGIA.....	02
2.2	SINALIZAÇÃO DA INSULINA	04
2.3	EFEITO DO EXERCÍCIO NA VIA DE SINALIZAÇÃO DA INSULINA.....	05
2.4	OBESIDADE, INFLAMAÇÃO E RESISTÊNCIA À INSULINA	07
2.5	EXERCÍCIO FÍSICO, RESISTÊNCIA À INSULINA E DIABETES	12
3	OBJETIVOS.....	15
3.1	OBJETIVOS GERAIS.....	15
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
4	JUSTIFICATIVA.....	16
5	MATERIAIS E MÉTODOS	17
5.1	CARACTERIZAÇÃO DOS ANIMAIS	17
5.2	PROGRAMA DE TREINAMENTO FÍSICO.....	18
5.3	AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS METABÓLICOS	18
5.4	DETERMINAÇÃO DA GLICOSE E INSULINA	18
5.5	TESTE DE TOLERÂNCIA INTRAPERITONEAL À INSULINA.....	19
5.6	EXTRAÇÃO DO MÚSCULO E TECIDO ADIPOSEO	19
5.7	IMUNOBLOT	20
5.8	ANTICORPOS.....	20
5.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	21
6	RESULTADOS.....	22
6.1	PARÂMETROS FISIOLÓGICOS E METABÓLICOS.....	22

6.2 O TREINAMENTO FÍSICO MELHOROU A ATIVIDADE DA AKT NO MÚSCULO ESQUELÉTICO DOS RATOS	23
6.3 TREINAMENTO FÍSICO AUMENTA A SENSIBILIDADE À INSULINA.....	24
7 DISCUSSÃO	26
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	35
9 REFERÊNCIAS.....	36

1. INTRODUÇÃO

A obesidade é uma doença crônica multifatorial com forte associação com a diabetes. A hipertrofia do tecido adiposo está associada com uma inflamação de baixo grau resultante da liberação de adipocinas por parte dos adipócitos em excesso, sendo a principal delas o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), capaz de ativar proteínas pró-inflamatórias, principalmente JNK e IKK, de efeito prejudicial à via de transdução do sinal da insulina, causando resistência a este hormônio em indivíduos obesos e consequentemente podendo levar ao desenvolvimento do diabetes *mellitus* do tipo 2 (DM2). Além disso, grandes quantidades de ácidos graxos livres (AGLs) circulantes, advindos da constante lipólise do tecido adiposo em excesso e da alimentação rica em gordura, prejudicam o sinal da insulina na obesidade, interferindo negativamente na captação de glicose e síntese de glicogênio. Por outro lado, o exercício físico tem sido reconhecido há muito anos como ferramenta importante para prevenção e tratamento de uma série de doenças crônicas degenerativas, incluindo a diabetes.

O exercício físico realizado regularmente pode favorecer a perda de peso e a redução do conteúdo de gordura corporal. Além disso, o exercício aumenta a captação de glicose e a síntese de glicogênio, reduz a resistência à insulina (RI) e diminui a hiperglicemia. Os efeitos do exercício físico sobre organismos insulino-resistentes são diversos, com destaque da melhora na via de sinalização da insulina através da maior expressão e atividade de proteínas responsáveis pela transdução do sinal do hormônio. Em especial destaca-se a participação da proteína quinase B (Akt), uma proteína distal da via molecular da insulina determinante para translocação dos transportadores de glicose (GLUT's) localizados no músculo esquelético. Embora sejam reconhecidas algumas funções moleculares do exercício físico, em especial sobre a atividade da Akt, ainda não está totalmente elucidada qual a melhor intensidade de treinamento para causar ativação desta proteína. Desse modo, se faz importante outros estudos a fim de investigar o papel da intensidade de esforço sobre a sensibilidade à insulina e atividade da Akt em organismos com resistência à insulina.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. EPIDEMIOLOGIA

Diabetes caracteriza-se por uma alteração metabólica crônica que afeta aproximadamente 5% da população em nações industrializadas. A deficiência ou grave redução na secreção de insulina devido a destruição auto-imune das células pancreáticas, mais especificamente das células beta das ilhotas de Langerhans, é responsável pela indução de diabetes *mellitus* do tipo 1 (DM1). A forma mais prevalente, o diabetes *mellitus* tipo 2, representa mais de 90% dos casos da doença. A epidemia liderada pelo DM2 é conhecida como “diabesidade”, o que demonstra sua forte correlação com a obesidade (HOSSAIN et al., 2007).

Atualmente, mais de 1.1 bilhão de adultos apresentam sobrepeso e 312 milhões são obesos em todo mundo. Além disso, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) pelo menos 155 milhões de crianças estão acima do peso ou desenvolverão obesidade. Acredita-se que mudanças no comportamento alimentar, e a adoção de hábitos de vida sedentários podem atuar sobre genes de susceptibilidade sendo determinante ao crescimento da obesidade no mundo.

A prevalência de obesidade e síndromes metabólicas está aumentando rapidamente em países em desenvolvimento, levando a um aumento da morbidade e mortalidade por causa do DM2. As principais causas seriam a urbanização, transição nutricional e redução da atividade física (MISRA e KHURANA, 2008).

Até alguns anos atrás, o DM2 era uma doença encontrada predominantemente no adulto; no entanto, nos últimos anos tem se verificado um aumento da prevalência desta doença em crianças e adolescentes. Neste sentido, deve-se enfatizar que o DM2 tem contribuído com mais de 30% dos novos casos de diabetes, mostrando uma possível relação do aumento da prevalência de obesidade infantil com o desenvolvimento desta doença (OLIVEIRA et al., 2004).

Com a modernidade e tecnologias desenvolvidas nas últimas décadas (jogos eletrônicos e computadores), os níveis de atividade física vêm diminuindo gradualmente da infância até a fase adulta. Isso está diretamente associado com o

aumento cada vez maior da obesidade e consequentemente com o desenvolvimento do quadro de resistência à insulina na fase adulta (DWYER et al., 2009).

As especulações não são animadoras para essa realidade humana. Com a manutenção ou progressiva acentuação deste estilo de vida que não é dotado de atividade física e alimentação saudável, o prognóstico é de aumento das taxas de prevalência de DM2, que acompanha a crescente aceleração do número de indivíduos obesos do planeta. Aproximadamente 90% dos DM2 apresentam excesso de gordura corporal. Vale lembrar, que 197 milhões de pessoas em todo o mundo apresentam intolerância à glicose, comportamento metabólico que antecede o desenvolvimento do diabetes. O diagnóstico para o futuro próximo é de aumento, e a incidência deve ser de 420 milhões até 2025 (HOSSAIN et al., 2007).

Nas Américas, o número de indivíduos com diabetes foi estimado em 35 milhões para o ano 2000 e projetado para 64 milhões em 2025. No Brasil, a perspectiva para os anos de 1995 e 2025, mostra que o país deve estar entre os 10 países com maior incidência de diabetes (KING et al., 1998). De acordo com o projeto Vigitel 2007 (Sistema de Monitoramento de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas Não Transmissíveis), a ocorrência média de diabetes na população adulta brasileira acima de 18 anos é de 5,2%, o que representa 6.399.187 de pessoas portadoras da doença. (MINISTÉRIO DA SAÚDE).

Além de ser prejudicial e limitante a saúde do indivíduo, o diabetes é oneroso aos cofres públicos. Por exemplo, o total de gastos médicos com o DM2 em oito países europeus foi de 29 bilhões de euros por ano (JÖNSSON, 2002). Estes dados mostram que se fazem necessários programas públicos de prevenção ao desenvolvimento da diabetes, incluindo profissionais de Educação Física para inclusão de atividade física supervisionada para mudança do estilo de vida sedentário.

Enquanto a mais de meio século, evidências epidemiológicas, experimentais e clínicas demonstraram uma correlação positiva entre uma dieta inadequada e o risco de doenças, apenas recentemente se reconhece cientificamente que a adoção de um estilo de vida sedentário inicia rapidamente uma série de más adaptações que causam doenças crônicas como o diabetes (BOOTH et al., 2000; BOOTH et al., 2008). Fatores ambientais e comportamentais em conjunto com a suscetibilidade genética podem levar um indivíduo a desenvolver DM2 (ZIMMET, 2001).

Por outro lado, recentemente foi demonstrado que a redução de peso corporal associada com o aumento da atividade física em indivíduos com risco aumentado para desenvolver diabetes reduz em 58% a incidência dessa doença (KNOWLER et al., 2002). No entanto, para melhor compreensão do efeito do exercício físico sobre o metabolismo da glicose se faz necessário primariamente uma breve descrição da via de sinalização da insulina.

2.2. SINALIZAÇÃO DA INSULINA

A insulina é um hormônio polipeptídico anabólico produzido pelas células beta do pâncreas, cuja síntese é ativada pelo aumento dos níveis circulantes de glicose e aminoácidos após as refeições. Sua ação acontece em vários tecidos periféricos, incluindo fígado, músculo esquelético e tecido adiposo. Seus efeitos metabólicos imediatos incluem: aumento da captação de glicose, principalmente em tecido muscular e adiposo, aumento da síntese de proteínas, ácidos graxos e glicogênio, bem como bloqueio da produção hepática de glicose, da lipólise e proteólise, entre outros.

A sinalização intracelular da insulina começa com sua ligação a um receptor específico de membrana, uma proteína heterotetramérica com atividade quinase, composta por duas subunidades alfa e duas subunidades beta denominada receptor de insulina (IR). A ativação do IR resulta em fosforilação em tirosina de diversos substratos, incluindo substratos do receptor de insulina 1 e 2 (IRS-1) e (IRS-2). A fosforilação das proteínas IRSs cria sítios de ligação para outra proteína citosólica denominada fosfatidilinositol 3-quinase (PI3q), promovendo sua ativação. A PI3q é importante na regulação da mitogênese, diferenciação celular, e transporte de glicose estimulada pela insulina. A ativação da PI3q aumenta a fosforilação em serina da Akt e isto permite o transporte de glicose no músculo e tecido adiposo através da translocação da proteína GLUT4 para membrana celular, a síntese de glicogênio no fígado e músculo, e da lipogênese no tecido adiposo (WHITE, 1998; SALTIEL e KAHN, 2001).

Portanto, a via PI3q/Akt tem um importante papel nos efeitos metabólicos da insulina. O esquema resumido das etapas de sinalização da insulina envolvida na captação de glicose encontra-se apresentado na figura 1.

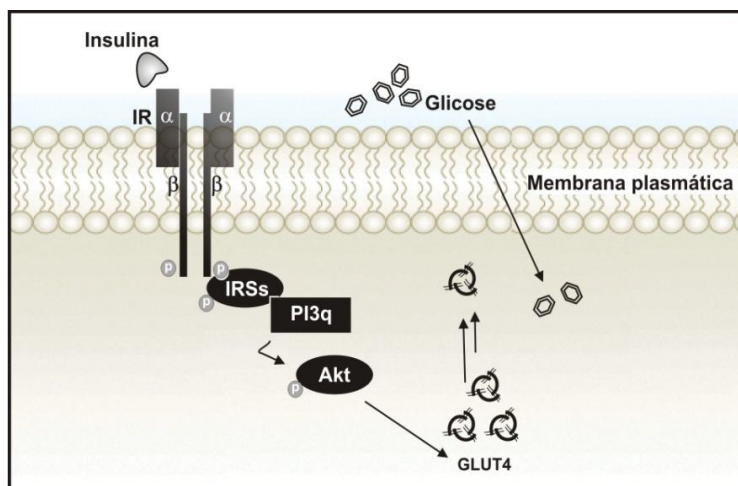


Figura 1. Via de sinalização da insulina na captação de glicose.

2.3. EFEITO DO EXERCÍCIO NA VIA DE SINALIZAÇÃO DA INSULINA

Enquanto a inatividade física é o maior fator de risco para o aparecimento de muitas doenças metabólicas como a diabetes (BOOTH, 2000), evidências epidemiológicas demonstram que exercícios físicos regulares em longo prazo podem reduzir significativamente os riscos de desenvolver DM2 (GOODYEAR e KAHN, 1998). O treinamento em humanos leva a uma série de adaptações benéficas no músculo esquelético como aumento no número e tamanho das mitocôndrias, aumento da força, resistência e flexibilidade, além do aumento da expressão de GLUT-4. Por isso, o exercício físico é um importante fator na prevenção e tratamento da maioria das doenças relacionadas com o estilo de vida como a obesidade e o DM2 (GOODYEAR e KAHN, 1998; HAWLEY, 2004; HAWLEY e LESSARD, 2008).

O GLUT-4 é o mais importante transportador de glicose no músculo esquelético, e a sua translocação do meio intracelular até a membrana plasmática é

o principal mecanismo pelo qual tanto a insulina quanto o exercício físico fazem o transporte de glicose no músculo esquelético (HAYASHI et al., 1997).

A translocação de GLUT-4 pelo exercício ocorreria devido à liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático provocada pela contração muscular, enquanto que a insulina utilizaria um mecanismo dependente da PI-3q (HAYASHI et al., 1997). Além disso, a atividade da óxido nítrico sintase (NOS) e a síntese por ela de óxido nítrico (NO) podem estimular a captação de glicose através do aumento da translocação do GLUT-4 para a membrana durante a contração muscular (YOUN et al., 1991; ROBERTS et al., 1999).

O exercício agudo não é capaz de aumentar a fosforilação em tirosina do IR e do IRS-1 estimulados por insulina (HENRIKSEN, 2002). No entanto, uma única sessão de exercício otimiza o efeito da insulina na fosforilação do IRS-2, tendo como consequência uma maior associação com PI3-q. (HOWLETT et al., 2002). Já de forma crônica, o exercício aumenta a fosforilação em tirosina de IRS-1 e IRS-2 assim como a sua associação com a PI3-kinase (LUCIANO et al., 2002). Além do mais, também ocorre uma maior fosforilação em serina da Akt, proteína fundamental para iniciar a translocação do GLUT4 para a membrana citoplasmática (WOJTASZEWSKI et al., 1999).

Além disso, foi demonstrado que a contração muscular estimula a captação de glicose sem necessariamente causar fosforilação em tirosina do IR e dos seus substratos (IRS-1 e IRS-2), assim como a PI3q. Tal fato foi confirmado depois que experimentos bloquearam farmacologicamente a PI3q e mesmo assim o transporte de glicose estimulado pela contração muscular continuou acontecendo (HAYASHI et al., 1997).

Foi então que houve a descoberta da proteína quinase ativada por AMP (AMPK), uma enzima chave de resposta à contração muscular, que também estimula o transporte de glicose no músculo esquelético, mas por meio de um mecanismo independente de insulina. Acredita-se ainda que existam vesículas de GLUT-4 com respostas específicas a cada uma dessas vias moleculares no músculo. A ativação da AMPK ocorre quando a relação AMP:ATP aumenta, ou seja, quando se tem uma diminuição da energia celular. Nesta situação, ocorre uma mudança conformacional na molécula, tornando-a suscetível à fosforilação e ativação pela AMPK quinase (AMPKK) (HARDIE e CARLING, 1997).

Uma vez fosforilada a AMPK ativa vias que geram o aumento de ATP, como a oxidação de ácidos graxos. Porém, ela também é capaz de desativar as vias que consomem ATP como a síntese de ácidos graxos. Durante o exercício, a necessidade de gerar ATP vai aumentar a atividade da AMPK, promovendo uma maior translocação de GLUT-4 e facilitando o transporte de glicose para o músculo de maneira semelhante à insulina, porém por cascatas de sinalização diferentes e independentes. Somado a isso, ocorre um aumento na eficiência do transporte de ácidos graxos para as mitocôndrias e conseqüentemente maior oxidação (SIMONEAU et al., 1999).

Portanto, o exercício físico e a insulina utilizam vias distintas de sinalização para ativação do transporte de glicose no músculo esquelético, isto explica por que pacientes com resistência à insulina podem ativar normalmente o transporte de glicose para o músculo através do exercício mesmo na ausência do hormônio (GOODYEAR e KAHN, 1998). Inclusive, há estudos que apontam a existência de um conteúdo intracelular de GLUT4 estimulado por insulina e outro estimulado pelo exercício físico, sugerindo que a contração muscular estimula uma via de sinalização intracelular distinta da cascata insulínica (DOUEN et al., 1990; CODERRE et al., 1995).

2.4. OBESIDADE, INFLAMAÇÃO E RESISTÊNCIA À INSULINA

A resistência à insulina (RI) é definida como uma diminuição na resposta dos tecidos periféricos à ação da insulina. A relação entre obesidade e diabetes já está bem estabelecida há anos, sendo que a maior prova para esta relação está na capacidade do tecido adiposo em causar RI e conseqüentemente DM2 (XU et al., 2003).

Os macrófagos no tecido adiposo branco (TAB) desempenham um papel ativo na obesidade e as atividades inflamatórias relacionadas com os macrófagos podem contribuir para a patogênese da RI induzida pela obesidade. Logo, a RI relacionada com a obesidade esta associada com uma condição inflamatória crônica proveniente no tecido adiposo hipertrofiado (XU et al., 2003).

Alterações na sensibilidade e na secreção de insulina são eventos metabólicos que podem ser identificados em indivíduos obesos que desenvolverão diabetes, anos antes de a doença se tornar evidente (SHULMAN, 2000).

A resistência à ação da insulina nos tecidos e os níveis elevados de insulina plasmática em jejum, alterações comuns em indivíduos obesos, são alguns dos sinais que podem levar ao desenvolvimento do DM2. Em geral nos indivíduos obesos, nos estágios iniciais da doença, devido à resistência à insulina, as células β pancreáticas aumentam a produção e a secreção do hormônio como mecanismo compensatório, enquanto a tolerância à glicose permanece normal. Este estado permanece durante algum tempo, até que se observa um declínio na secreção de insulina e, conseqüentemente, uma diminuição da tolerância à glicose (OLIVEIRA et al., 2004).

Ainda não é totalmente conhecido o mecanismo envolvido na causa da resistência à insulina. Porém, muitos estudos demonstraram que alterações moleculares na via de sinalização da insulina, principal responsável pela ativação da translocação do transportador de glicose (GLUT's) à membrana plasmática, são determinantes no estado de resistência à insulina em tecidos periféricos, como o músculo esquelético e o tecido adiposo (HOTAMISLIGIL et al., 1996; TSUKUMO et al., 2004; DANDONA et al., 2004; WAKI e TONTONOZ, 2007).

O GLUT-4 é o transportador dependente de insulina encontrado em maior quantidade nas membranas celulares do tecido adiposo e do músculo esquelético. Sem o estímulo da insulina, o GLUT-4 fica armazenado em vesículas citoplasmáticas e sua concentração na membrana se torna muito baixa. Após ser estimulado pelo hormônio, o transporte de glicose é aumentado, pois esses transportadores são translocados para a membrana da célula (FOSTER e KLIP, 2000).

Na obesidade ocorrem alterações em vários pontos da via de sinalização da insulina, com redução na concentração e atividade quinase do IR, na concentração e fosforilação do IRS-1 e IRS-2, na associação da PI3q com os IRSs, na translocação dos GLUT's e na atividade das enzimas intracelulares. Isso ocasiona uma diminuição da captação de glicose nos tecidos insulino-dependentes, como músculo esquelético e tecido adiposo (PAULI et al., 2009). Dentre as causas deste prejuízo sobre a sinalização da insulina na obesidade, destaca-se a presença excessiva de AGLs circulantes e o processo inflamatório de baixo grau descrito a seguir.

Níveis elevados de AGLs circulantes, comum em indivíduos obesos, podem causar alterações na secreção e ação da insulina, levando a RI e posteriormente ao DM2 (SHULMAN, 2000). Isto ocorreria, pois elevados níveis de AGLs inibem a captação de glicose, a síntese de glicogênio, a glicólise e aumentam a produção de glicose por parte de fígado. Os AGLs ainda causam redução da fosforilação (insulino-estimulada) do IRS-1 em tirosina e na sua associação com a PI3q. Além disso, os AGLs também estimulam a expressão de enzimas gliconeogênicas (SHULMAN, 2004), aumentando os níveis de glicose circulante, e podendo de maneira crônica, mesmo que discreta, agravar a resistência e a secreção de insulina (SHULMAN, 2000).

A presença de elevados níveis de AGLs circulantes está associada a uma menor fosforilação em sítios específicos e à menor ativação de proteínas-chave da via da insulina (IRSs/PI3q). Isto ocorreria porque os metabólitos provenientes da oxidação das gorduras no músculo são capazes de fosforilar em serina o IR e seus substratos. Evidências científicas apontam uma relação direta entre obesidade, AGLs e resistência à insulina. (SHULMAN, 2004; SAVAGE et al., 2007).

Uma vez que o IRS-1 é fosforilado em serina, este se torna incapaz de ser fosforilado em tirosina, impedindo assim a ativação da PI3q e bloqueando a transmissão do sinal da insulina. Além do mais, o IRS-1 quando é fosforilado em serina pode inibir a ativação do IR de maneira retrógrada, pois uma vez ligado ao receptor, ele prejudica o sinal da insulina para outras moléculas de IRS-1, ou ainda para outros substratos deste receptor devido à inibição de sua capacidade tirosina-quinase, (HOTAMISLIGIL, et al., 1996).

Compreender os mecanismos fisiopatológicos que levam a obesidade é de suma importância para que se possam entender também os mecanismos que levam a resistência à insulina devido à inflamação de tecidos metabólicos, visto que o TNF- α e outras citocinas inflamatórias produzidas também no tecido adiposo podem fosforilar em serina proteínas chaves na via de sinalização da insulina, prejudicando a transmissão do sinal (SHULMAN, 2000; WAKI, 2007).

Hoje se sabe que ácidos graxos provenientes da ingestão de gordura, principalmente de origem animal, ativam os toll like receptors (TLR), proteínas receptoras de membrana celular, sensíveis a patógenos e que desempenham importante atividade pró-inflamatória e têm consequências negativas as ações da insulina em tecidos metabólicos. Esses receptores, principalmente o TLR-4, um dos

tipos de toll like receptors é mediador da via inflamatória, são sensíveis também a alguns nutrientes como os ácidos graxos. Ao se ligarem a esse receptor de membrana celular (TLR-4), alguns ácidos graxos acionariam proteínas de resposta inflamatória como a JNK e IKK, que bloqueiam a ação da insulina, mesmo na ausência de patógenos. Essa resposta também seria capaz de interferir nos sinais mediados pelos hormônios controladores da fome e gasto energético, podendo resultar em obesidade. Com essas descobertas podemos considerar que o TLR-4 seja o elo entre a ingestão de dietas ricas em gordura e o desenvolvimento de resistência à insulina (TSUKUMO et al., 2004; DANDONA et al., 2004; WAKI, 2007; MILANSKI et al., 2009).

O tecido adiposo hipertrofiado é infiltrado por macrófagos que produzem uma série de adipocinas, entre elas o TNF- α , que ativam substratos intermediários de sua via de sinalização como a JNK e IKK. Essas quinases causam a fosforilação em serina dos substratos de IR. A ativação da serina quinase JNK pode interferir na funcionalidade dos substratos dos receptores de insulina (IRS-1 e IRS-2), visto que, uma vez fosforilados em serina pela JNK, a possibilidade de serem fosforilados em tirosina pelo receptor de insulina fica comprometida, contribuindo para redução na transmissão do sinal da insulina por essa via (SHOELSON et al., 2003; HOTAMISLIGIL, 2003).

Outra maneira dos substratos dos receptores de insulina (IRSs) serem fosforilados em serina é através da via pró-inflamatória IKK/I κ B/NF- κ B, que pode ser ativada pelo TNF- α presente no tecido adiposo. A ativação da IKK promove a dissociação do complexo I κ B/NF- κ B e migração ao núcleo do NF- κ B que faz a transcrição de genes inflamatórios (por exemplo, TNF- α), mas também pode induzir a fosforilação em serina dos IR e seus substratos, o que compromete a transmissão do sinal da insulina através desta cascata (SHOELSON et al., 2003; HOTAMISLIGIL, 2003).

Deste modo, as vias metabólicas e inflamatórias se sobrepõem devido à ativação principalmente destas duas quinases presentes na obesidade (JNK e IKK). Estas quinases são as mesmas que são ativadas na resposta imune inata pelo TLR-4 em resposta aos Lipopolissacarídeos (LPS) e outros produtos microbianos. Essa é uma possível conexão entre a obesidade e uma inflamação sistêmica de baixa intensidade que geralmente se observa em indivíduos que estão com sobrepeso (ROPELLE et al., 2007; PAULI et al., 2008).

A ausência da JKK melhora a capacidade de sinalização dos receptores de insulina, pelo menos em parte, através de seus efeitos na fosforilação em serina do IRS-1. É claro que mecanismos adicionais também podem estar envolvidos na ação da JNK ou na ligação entre a resistência à insulina e a fosforilação em serina do IRS-1. Há evidências de que a obesidade está associada a níveis elevados da atividade da JNK. Além disso, a ausência de JNK resultou numa importante proteção contra a resistência à insulina induzida pela obesidade. A produção elevada de citocinas pró-inflamatórias como o $\text{TNF-}\alpha$, também são fatores cruciais na resistência à insulina provocada pela obesidade, uma vez que o $\text{TNF-}\alpha$ é um potente ativador da JNK, que por sua vez, fosforila em serina o IRS-1. Logo, a JNK mostrou-se um importante componente da via bioquímica responsável pela resistência à insulina induzida pela obesidade (HIROSUMI et al., 2002).

Resumindo, a obesidade inibe a sinalização da insulina, pois é capaz de produzir uma série de moléculas bioquímicas provenientes dos adipócitos ou dos macrófagos. Essas moléculas ativam serinas quinases, principalmente a JNK e IKK, que podem fosforilar em serina o IR e seus substratos, dificultando a transmissão do sinal de insulina (Figura 2).

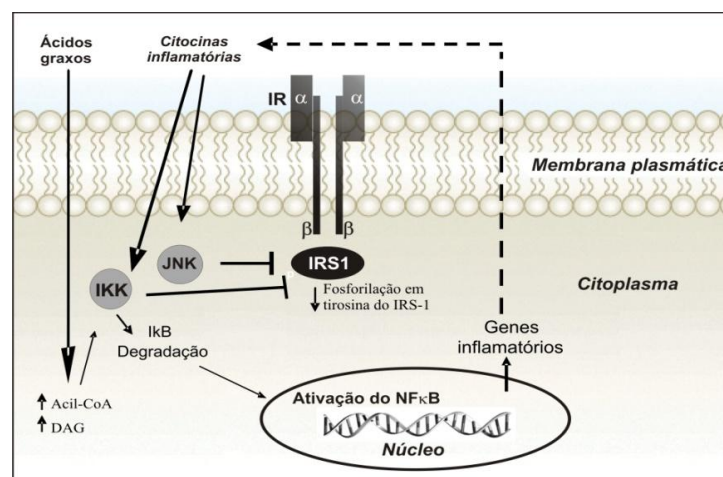


Figura 2. As vias inflamatórias podem ser ativadas por citocinas, como o $\text{TNF}\alpha$ e acúmulo dos metabólitos dos ácidos graxos (Acil-CoA e diacilgliceróis-DAG), sinais que convergem para vias de sinalização inflamatórias, incluindo as quinases IKK e JNK. Além disso, a ativação da IKK promove a dissociação do complexo I κ B/NF- κ B e migração ao núcleo do NF- κ B que faz a transcrição de genes inflamatórios (por exemplo, $\text{TNF-}\alpha$). Portanto, estas vias levam a produção de outros mediadores inflamatórios através do controle da transcrição gênica, bem como a inibição da sinalização da insulina.

2.5. EXERCÍCIO FÍSICO, RESISTÊNCIA À INSULINA E DIABETES

A inatividade física comum nos dias de hoje contribui para o desenvolvimento da resistência à insulina (BASSUK e MANSON, 2005). Alguns estudos mostraram que o exercício físico pode aumentar a sensibilidade à insulina, mesmo sem redução de peso e da gordura corporal (O'DONOVAN et al., 2005). Isto ocorreria porque o exercício físico tem a capacidade de aumentar a expressão de alguns elementos intracelulares da via de sinalização da insulina, principalmente o GLUT-4, na musculatura esquelética (TERAN-GARCIA et al., 2005). Portanto, a contração muscular provocada pelo exercício físico é capaz de aumentar a sinalização da insulina e a captação de glicose em indivíduos com DM2 (KENNEDY et al., 1999).

Pesquisadores notaram diminuição dos níveis de insulina e melhora na tolerância à glicose em homens que competiam quando comparados com homens de um grupo controle. Os mesmos pesquisadores também perceberam mais tarde que mulheres obesas e hiperinsulêmicas tiveram seus níveis de insulina no plasma diminuídos após 6 semanas de treinamento (BJORNTORP et al., 1970; BJORNTORP et al., 1972). Posteriormente, foi comprovado que o exercício físico regular aumenta a sensibilidade à insulina não só no músculo, mas em outros tecidos (MONDON et al., 1980).

Além disso, novas evidências científicas mostram que o exercício físico pode, além dos efeitos positivos sobre a via de sinalização dependente de insulina (IR/IRSs/PI3-q/Akt) e/ou independente de insulina (via AMPK), também beneficiar o indivíduo obeso com resistência à insulina por diminuir a expressão e/ou atividade de proteínas inflamatórias de efeito negativo à ação da insulina (ROPELLE et al., 2007; PAULI et al., 2008).

Estudos associam o exercício físico com a redução dos processos inflamatórios provenientes da obesidade (PETERSEN e PEDERSEN, 2005; HANDSCHIN e SPIEGELMAN, 2008). O tecido adiposo em excesso produz de duas a três vezes mais citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α , que desempenharão um papel fundamental no quadro de resistência à insulina, como previamente documentado. Logo, podemos concluir que o exercício físico será um agente anti-

inflamatório de grande importância por reduzir a gordura corporal e desta forma reduzir os níveis de citocinas pró-inflamatórias (PAULI et al., 2009).

Entretanto, alguns estudos com roedores e seres humanos revelaram que mesmo sem redução do peso corporal, o exercício físico pode reduzir os níveis de citocinas pró-inflamatórias (PETERSEN e PEDERSEN, 2005). Adicionalmente, em estudos com voluntários obesos, foi demonstrado que uma única sessão de exercício é capaz de reduzir os níveis séricos de TNF- α e da proteína-C reativa, mesmo sem alteração do peso corporal total (FISCHER et al., 2007).

Ainda não se sabe como as respostas anti-inflamatórias mediadas pelo exercício acontecem a nível intracelular, apesar disso já estar bem esclarecido que o treinamento é um importante agente anti-inflamatório. Em estudos com humanos, evidências experimentais demonstraram que a resposta anti-inflamatória observada no músculo esquelético após uma sessão aguda de exercício ocorre através de mecanismos distintos. Em ratos obesos induzidos por dieta hiperlipídica, uma única sessão de natação reduziu a fosforilação da JNK, bloqueou a via IKK/NF κ B e reduziu a fosforilação em serina do IRS-1, além de restabelecer a sensibilidade à insulina 16 horas após o término do exercício (ROPELLE et al., 2007). Para entendimento dos efeitos do exercício sobre a inflamação da obesidade ver figura 3.

Não obstante, foi demonstrado que após a perfusão de ácidos graxos em seres humanos, uma única sessão de exercício físico foi eficiente na redução da fosforilação da JNK e no bloqueio da via IKK/NF κ B. O bloqueio desta via também foi observado no músculo de pacientes diabéticos devido a uma menor taxa de degradação do I κ B α e do I κ B β , impedindo que o fator de transcrição κ B (NF κ B) iniciasse a transcrição de proteínas pró-inflamatórias. Em suma, o exercício físico diminui os níveis séricos de TNF- α em pacientes com DM2 devido ao bloqueio da via inflamatória IKK/NF κ B (SRIWIJITKAMOL et al., 2007).

Embora não faltem evidências coesas a respeito dos efeitos do exercício físico sobre a melhora da resistência à insulina provocada pela obesidade, ainda não está bem esclarecido qual intensidade de treinamento aeróbio provoca melhor resposta na via de sinalização da insulina.

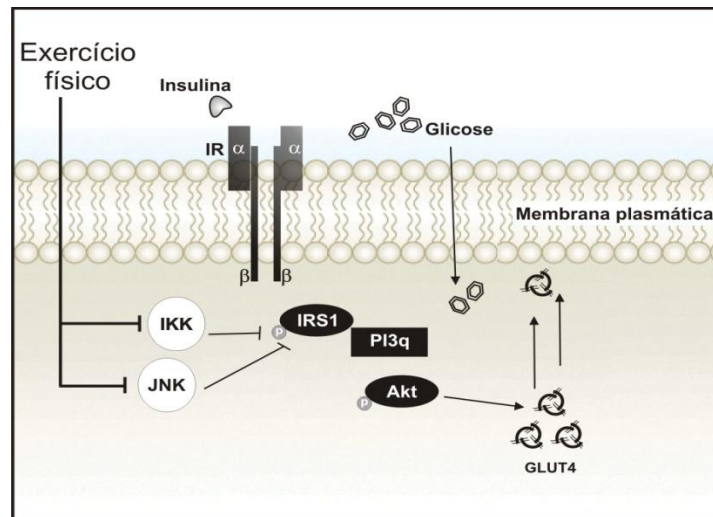


Figura 3. O exercício físico reduz a expressão e/ou atividade de proteínas intracelulares de efeito negativo sobre a via de sinalização da insulina e com isso aumenta a sensibilidade à insulina e melhora a captação de glicose na obesidade.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVOS GERAIS:

O objetivo do presente estudo foi verificar o efeito da intensidade do treinamento físico sobre a sensibilidade à insulina e atividade da Akt no músculo esquelético de ratos obesos induzidos por dieta hiperlipídica.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Avaliar a massa corporal, a gordura epididimal, a glicemia e a insulinemia de jejum.
- Verificar o efeito do treinamento físico em duas intensidades diferentes sobre a sensibilidade à insulina periférica e atividade da Akt no músculo esquelético.

4. JUSTIFICATIVA

Embora o exercício físico seja considerado uma das principais ferramentas para se diminuir a resistência à insulina e consequentemente ajudar na prevenção e tratamento do DM2, evidências científicas não são claras quanto à melhor intensidade de treinamento físico para que isso aconteça. Visto isso, nosso estudo visa elucidar tal questão a fim de se obter um novo conhecimento a cerca de qual intensidade de exercício seria mais efetiva na redução da resistência à insulina.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. CARACTERIZAÇÃO DOS ANIMAIS

Foram utilizados vinte e quatro (n=24) ratos Wistar com seis semanas de vida, provenientes do Biotério da Universidade do Extremo Sul de Santa Catarina - UNESC, Criciúma - SC. Os animais foram alocados, na mesma instituição, em gaiolas individuais e receberam água e dois tipos de dieta: ração padrão para roedores (C) ou dieta hiperlipídica (DHL) durante o período experimental, *ad libitum* (detalhes da dieta, ver referência PAULI et al, 2008). Os camundongos foram expostos a ciclos de 12 horas claro e 12 horas escuro e mantidos a temperatura de 20°C e 22°C. Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro subgrupos: grupo controle (n=6) que recebeu dieta padrão (C); grupo obeso sedentário (n=6) que recebeu DHL por 12 semanas (OS); grupo obeso treinado (n=6) que recebeu DHL por 12 semanas e foi submetido a um programa de treinamento sem sobrecarga adicional ao peso corporal (OT-1); e grupo obeso (n=6) que também recebeu a DHL por 12 semanas e foi submetido a um protocolo de treinamento com sobrecarga correspondente a 5% do peso corporal do animal (OT-2). Todos os experimentos a seguir relatados foram realizados no laboratório de fisiologia e bioquímica, do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense, em Criciúma/SC. Para acompanhamento dos estágios de treinamento e aprendizado das técnicas utilizadas e a seguir descritas, foram feitas visitas ao laboratório de sinalização celular situado na Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp-Campinas. Além disso, as amostras do músculo gastrocnêmio foram utilizadas e processadas como descritas no material e método no mesmo laboratório de sinalização celular previamente descrito.

5.2. PROGRAMA DE TREINAMENTO FÍSICO

O protocolo de exercício físico consistiu de natação, em grupos de seis animais, e foi realizado em tanques cilíndricos de diâmetro interno de 60 cm e 100 cm de profundidade, com temperatura da água em 34 ± 1 °C. Os animais realizaram sessões de exercício de 1 hora, cinco vezes por semana, sem sobrecarga adicional para o grupo OT-1 ou com sobrecarga adicional equivalente a 5% do peso corporal para o grupo OT-2 em cada semana, presa a cauda. O treinamento físico teve duração de seis semanas.

5.3. AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS METABÓLICOS

Os animais foram avaliados quanto à massa corporal, níveis séricos de glicose e insulina no final do período experimental. Cinco animais de cada grupo foram aleatoriamente selecionados para realização de teste de tolerância à insulina uma semana antes do final do experimento.

5.4. DETERMINAÇÃO DA GLICOSE E INSULINA

A dosagem da glicose plasmática foi realizada através do método enzimático colorimétrico de glicose oxidase. A insulina plasmática das amostras de soro foi avaliada pelo método ELISA.

5.5. TESTE DE TOLERÂNCIA INTRAPERITONEAL À INSULINA (TTIP)

O teste foi realizado 24 horas após a última sessão de treino de natação. O alimento foi retirado seis horas antes do teste e a primeira coleta de sangue equivalerá ao tempo 0 do teste. Após isso, a insulina (2U/Kg de peso corporal) foi injetada intraperitonealmente e amostras de sangue foram coletadas pela cauda nos tempos 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos para a determinação da glicose sérica. A velocidade constante do decremento da glicose (Kitt) foi calculada usando a fórmula $0,693/t_{1/2}$. O $t_{1/2}$ da glicose foi calculado a partir da curva da análise dos mínimos quadrados da concentração da glicose sérica durante a fase de decaimento linear.

5.6. EXTRAÇÃO DO MÚSCULO E TECIDO ADIPOSEO

Os ratos foram anestesiados através da administração intraperitoneal de tiopental sódico (15mg/kg). A perda dos reflexos pedal e da córnea foram utilizados como controle da anestesia. A cavidade abdominal foi aberta, e após localização da veia porta 0,2 ml de salina ou insulina (10^{-6} mol/l) foram injetadas. Amostras do músculo gastrocnêmio foram retiradas após 90 s da injeção de insulina, e foram homogeneizado em tampão de imunoprecipitação contendo 1% de Triton X 100, 100mM de Tris (pH 7,4), 100mM de pirofosfato de sódio, 100mM de fluoreto de sódio, 10mM de EDTA, 10mM de vanadato de sódio, 2mM de PMSF e 0,1 mg/mL de aprotinina a 4°C. O homogeneizado foi então centrifugado à 11000 rpm por 30 minutos. No sobrenadante foi determinada a concentração de proteína utilizando o método de Bradford (BRADFORD, 1976) e posteriormente foi realizada a determinação do extrato total e o ensaio de imunoprecipitação com anticorpo específico. Ao final dos procedimentos experimentais o tecido adiposo epididimal foi retirado para pesagem em balança analítica.

5.7. IMUNOBLOT

Após determinação da concentração das proteínas foi aplicada a técnica de imunoblot e o uso de anticorpos específicos. De início as amostras após rápida fervura foram aplicadas em gel de poliacrilamida para separação por eletroforese (SDS-PAGE). As proteínas separadas em SDS-PAGE foram transferidas para membrana de nitrocelulose em aparelho de transferência da BIO-RAD. A membrana de nitrocelulose foi incubada “overnight” com anticorpo específico. A ligação de anticorpo a proteínas não-específicas foi minimizada pela pré-incubação da membrana de nitrocelulose com tampão de bloqueio (5% de leite em pó desnatado; 10 mmol/L de Tris; 150 mmol/L de NaCl; 0.02% de Tween 20) por 1,5 hora. O método de identificação utilizado foi a quimioluminescência que consiste de: as proteínas são transferidas para membranas de nitrocelulose (Biorad, Hercules/CA, USA), onde as proteínas de interesse são detectadas incubando-se as membranas com anticorpos primários, seguindo-se a exposição com anticorpos secundários conjugados com a horseradish peroxidase (HRP). As bandas imunorreativas são detectadas por quimioluminescência e a densitometria determinada por meio de sistema de captação e análise de imagem.

5.8. ANTICORPOS

Os anticorpos utilizados para o imunoblot foram anti-Akt e anti-phosphoserina Akt (Ser473) ambos da Santa Cruz Biotechnology, CA, USA.

5.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. Quando comparado dois grupos, foi utilizado teste t de *Student* para dados não pareados. Quando necessário utilizou-se análise de variância, seguida de teste post hoc de Bonferroni para comparação múltipla de médias, sendo adotado o nível de significância $p < 0.05$.

6. RESULTADOS

6.1. PARÂMETROS FISIOLÓGICOS E METABÓLICOS

A tabela 1 compara os dados dos ratos do grupo controle (C), dos ratos obesos sedentários (OS), dos ratos obesos que foram submetidos ao treinamento físico sem sobrecarga adicional (OT-1) e dos ratos obesos submetidos ao treinamento com sobrecarga adicional (OT-2). Observa-se que a massa corporal dos animais dos grupos OS, OT-1 e OT-2 foram significativamente superiores em relação ao grupo controle. No entanto, verifica-se que os animais dos grupos treinados tiveram redução significativa da massa corporal em relação ao grupo OS. Além disso, nota-se que os animais submetidos ao protocolo de treinamento com sobrecarga adicional de 5% (OT-2) tiveram significativa redução da massa corporal em relação ao grupo que treinou sem sobrecarga alguma (OT-1).

Em relação ao conteúdo de gordura epididimal, os resultados foram bastante semelhantes ao encontrado na massa corporal. Os roedores pertencentes aos grupos OS, OT-1 e OT-2 apresentaram peso da gordura epididimal significativamente superior em relação ao grupo controle. Por outro lado, ambas as formas de treinamento reduziu significativamente o conteúdo desta gordura quando comparado ao grupo sedentário. No entanto, não houve diferença significativa para este componente quando comparados os grupos OT-1 e OT-2.

Quanto à glicemia de jejum, os resultados mostram que os animais OS e OT-1 tiveram valores de glicose significativamente superiores em relação ao grupo controle e o mesmo não aconteceu para o grupo OT-2. Satisfatoriamente ambas as formas de treinamento promoveu redução significativa na concentração de glicose quando comparado ao grupo OS. Além disso, verifica-se que os animais treinados com sobrecarga adicional (OT-2) apresentaram valores significativamente inferiores ao grupo OT-1.

Por fim, os valores de insulinemia foram significativamente maiores nos ratos OS quando comparados aos demais grupos estudados. Os valores de insulina no sangue não diferiram estatisticamente entre os grupos controle e OT-1 e OT-2. No

entanto, os animais do grupo OT-2 apresentaram valores de insulina no sangue inferiores quando comparados ao grupo OT-1. Para melhor compreensão dos parâmetros fisiológicos, ver tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros fisiológicos.

Grupos/ Parâmetros	Peso Corporal (gramas)	Gordura Epididimal (gramas)	Glicemia Jejum (mg/dl ⁻¹)	Insulina Jejum (ng/ml ⁻¹)
C (n=6)	355 ± 10.6	6.5 ± 1.33	92.8 ± 2.96	2.46 ± 0.68
OS (n=6)	534 ± 16.8 ^a	25.4 ± 3.68 ^a	121 ± 7.32 ^a	3.96 ± 0.86 ^a
OT-1 (n=6)	498 ± 9.33 ^{a,b}	16.6 ± 4.21 ^{a,b}	108 ± 5.54 ^{a,b}	2.69 ± 0.32 ^b
OT-2 (n=6)	472 ± 11.58 ^{a,b,c}	12.8 ± 4.28 ^{a,b}	98.6 ± 4.58 ^{b,c}	2.58 ± 0.48 ^b

P<0.05, ^a ≠ C; ^b ≠ OS; ^c ≠ OT-1.

6.2. O TREINAMENTO FÍSICO MELHOROU A ATIVIDADE DA AKT NO MÚSCULO ESQUELÉTICO DOS RATOS

Na figura 1A, esta representada a fosforilação da Akt induzida por salina e insulina entre os grupos estudados. Houve aumento na fosforilação da Akt nos ratos controles que receberam injeção de insulina de 3.0 vezes quando comparado a seus pares com injeção salina. Nos ratos OS, a fosforilação da Akt foi reduzida após injeção de insulina em 1.9 vezes, quando comparado com os camundongos controles. Nos animais OT-1 e OT-2, a fosforilação da Akt aumentou em 1.6 e 1.9 vezes comparado aos animais OS respectivamente. Além disso, houve diferença estatística entre os grupos treinados tendo os ratos OT-2 apresentado maior fosforilação da Akt em relação aos ratos OT-1. Entretanto, não houve diferença na expressão da Akt entre os grupos estudados (figura 1A conteúdo abaixo do gráfico).

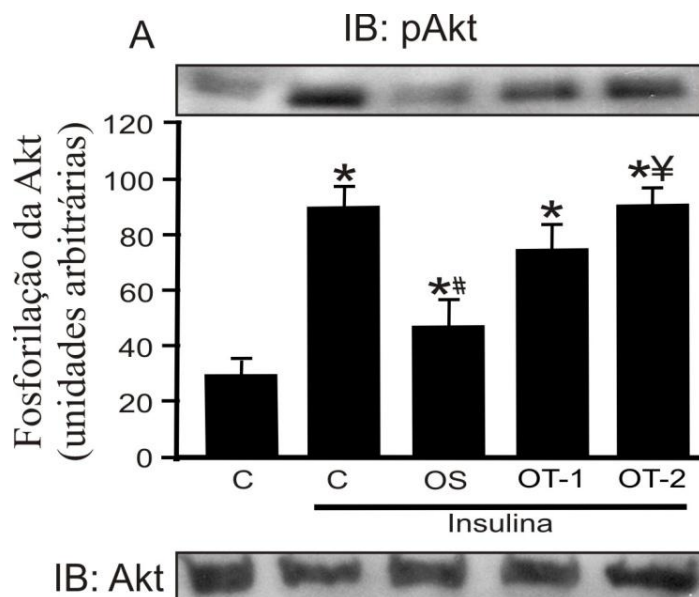


Figura 4. Sinalização da Insulina no tecido muscular. Após injeção de salina e de insulina nos ratos os tecidos musculares foram retirados. A amostra de tecido foi imunoblutada (IB) com anticorpos anti-phospho Akt e anti-Akt. * $p < 0,05$, ratos controles (C) injeção de salina versus ratos controle (C), ratos obesos sedentários (OS), ratos obesos que realizaram treinamento físico sem sobrecarga (OT-1) e ratos obesos que realizaram treinamento físico com sobrecarga de 5% da massa corporal total (OT-2) com injeção de insulina. # $p < 0,05$, ratos obesos sedentários (OS) versus ratos controle (C) injeção de insulina, ratos obesos que realizaram treinamento físico sem sobrecarga (OT-1) e ratos obesos que realizaram treinamento físico com sobrecarga de 5% da massa corporal total com injeção de insulina (OT-2). ¥ $p < 0,05$, ratos do grupo OT-2 versus ratos do grupo OT-1.

6.3. TREINAMENTO FÍSICO AUMENTA A SENSIBILIDADE À INSULINA

Na figura 3, são apresentados os resultados sobre a captação de glicose durante o teste de tolerância à insulina (TTI) dos grupos estudados. Observa-se que os ratos obesos tiveram redução significativa na captação de glicose em relação ao grupo controle. Por outro lado, os animais treinados tiveram aumento significativo na taxa de consumo de glicose quando comparados aos animais sedentários, sendo estes valores não estatisticamente diferentes do grupo controle. Os valores para os respectivos grupos foram: C, 5.4 ± 0.69 ; OS, 1.98 ± 0.48 ; OT-1, 4.36 ± 0.94 ; OT-2, 4.89 ± 0.56 .

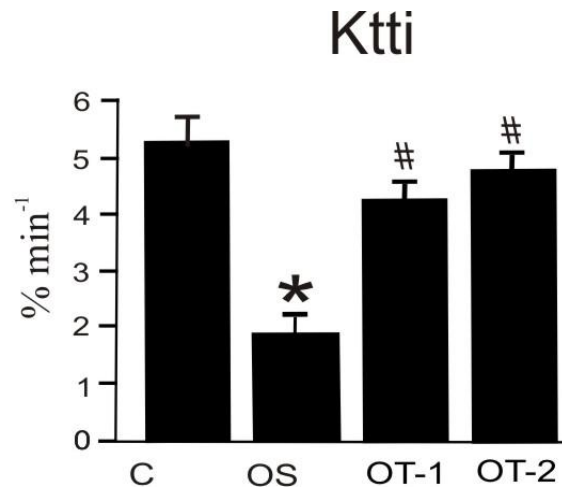


Figura 3. Teste de Tolerância à insulina (Kitt) dos diferentes grupos estudados. * $p < 0,05$, ratos obesos sedentários (OS) versus ratos controles (C); # $p < 0,05$, ratos treinados (OT-1 e OT-2) versus ratos obesos sedentários (OS).

7. DISCUSSÃO

O DM2 é uma doença crônica geralmente acompanhada por obesidade, principalmente na região visceral. No entanto, exercício físico regular é capaz de auxiliar na perda de peso e de gordura localizada, minimizando os efeitos deletérios desta doença.

No presente estudo, observou-se que a massa corporal e a gordura do epidídimo dos grupos OS, OT-1 e OT-2 foram significativamente maiores quando comparado com o grupo controle. Porém, ambas as formas de treinamento reduziu de forma significativa o peso e a gordura epididimal desses animais quando comparados aos animais do grupo OS. A única diferença observada entre estes dois parâmetros foi que, quanto à massa corporal, os animais treinados com sobrecarga de 5% do peso corporal (OT-2) tiveram significativa redução de peso quando comparados ao grupo que treinou sem sobrecarga (OT-1). E no que diz respeito à gordura epididimal, não houve diferença significativa entre os dois grupos de treinamento. Tal resultado é um indicativo importante para que as pessoas que necessitem perder peso e reduzir gordura corporal se insiram em programas regulares de atividade física.

Em um estudo realizado com humanos submetidos a 6 meses de treinamento aeróbio com diferentes intensidades e distâncias, foi demonstrado que comparando dois dos grupos, cujas distâncias eram semelhantes, aquele que realizou exercício na maior intensidade, apesar de ter obtido menor redução de massa corporal total devido ao maior ganho de massa magra, apresentou uma maior perda de massa de gordura (SLENTZ et al., 2004).

Outro estudo demonstrou uma perda de peso significativa e uma melhora no condicionamento cardiorrespiratório na combinação de diferentes intensidades e duração de exercício aeróbio durante 12 meses de treinamento em mulheres obesas e sedentárias. No entanto, não foram encontradas diferenças significativas na perda de peso entre os 4 grupos estudados. Este fato é decorrente do gasto calórico total ser semelhante, embora as intensidades e distâncias terem sido diferentes entre os grupos. Porém, o que importa aqui é que em todas as formas de corrida houve

redução de peso significativa em relação aos seus pares não treinados (JAKICIC et al., 2003).

Quando se comparou a frequência semanal do treinamento em humanos, para um mesmo protocolo (60 a 70% da FC máxima durante 45 minutos), Vancea et al. (2009) mostraram que o grupo que realizou o treinamento com maior frequência de treino conseguiu melhores resultados na maioria dos parâmetros avaliados, dentre eles a diminuição da glicemia de jejum e da circunferência da cintura. A redução da cintura é um importante parâmetro, pois apresenta forte relação com a gordura central, resistência à insulina, síndrome metabólica e doenças cardiovasculares (BOULÉ et al., 2005).

Tais achados científicos demonstram a importância da intensidade e do volume de esforço para a perda de peso e de gordura corporal. Nossos resultados estão de acordo com os estudos citados, uma vez que o grupo treinado com sobrecarga obteve resultados mais satisfatórios em relação ao peso corporal quando comparados ao grupo treinado sem sobrecarga adicional. Vale ressaltar que em nosso protocolo de treinamento o volume de exercício foi igual para ambos os grupos treinados.

Em uma metanálise, Boulé et al. (2003) concluíram que pacientes com DM2 treinados aerobicamente em intensidade moderada têm um aumento de 9.5% do VO₂ máx., no entanto, em intensidades mais altas, este número é ainda maior, e portanto capaz de maior redução nos riscos de doenças cardiovasculares e hemoglobina glicada. Além disso, o baixo condicionamento cardiorespiratório é um grande preditor de mortalidade em pessoas com diabetes (KOHL et al., 1992; WEI et al., 2000).

Embora não tenhamos analisado esse componente nos animais estudados, um aumento do consumo de oxigênio é reflexo de um maior número de mitocôndrias adquiridas pelo treinamento. Esse aumento na biogênese mitocondrial resulta em maior capacidade de utilização de ácidos graxos, que como previamente discutido na revisão de literatura, é capaz de prejudicar a via de sinalização da insulina. É possível que adaptações semelhantes tenham ocorrido nos animais em nosso estudo, auxiliando no mínimo em parte na melhora da sensibilidade à insulina.

Já segundo Silva e Lima (2002), o treinamento combinado de 10 semanas também obteve importantes melhoras em indivíduos com DM2 como uma redução significativa do IMC. Com isso, podemos afirmar que o exercício físico e redução do

peso corporal aumentam a sensibilidade à insulina, assim como o aumento do tecido adiposo reduz a sensibilidade a esse hormônio (KNOWLER et al., 2002; TUOMILEHTO et al., 2001).

Hansen et al. (2009) mostraram que, em humanos, quando o gasto energético total é igualado, o exercício aeróbio de intensidade de leve a moderada é tão efetivo quanto o de alta intensidade no que diz respeito à diminuição da hemoglobina glicada, da massa corporal e massa gorda, além de aumento da massa muscular. Isso ocorreria, pois a maior duração do exercício físico compensaria a menor intensidade. Apesar de mostrar certa controvérsia em relação aos nossos resultados, este estudo, ao contrário do nosso, ao aumentar a intensidade, reduz o volume do treinamento.

Em nosso estudo, observamos que na sobrecarga equivalente a 5% do peso corporal, representando um exercício de natação de intensidade moderada, os efeitos foram satisfatórios para alguns parâmetros, como glicemia e peso corporal.

Nesse contexto, no que diz respeito à glicemia de jejum, os resultados mostraram que os ratos do grupo OS e OT-1 tiveram valores significativamente maiores se comparados ao grupo controle. Já o grupo OT-2 não teve diferença significativa para o controle. De forma satisfatória, os dois protocolos de treinamento promoveram significativa redução na concentração da glicose se comparado ao grupo sedentário (OS). Além do mais, os animais do grupo treinado com sobrecarga apresentaram valores significativamente menores em relação ao grupo treinado sem sobrecarga. Mostrando de fato que a intensidade de exercício deve ser considerada num programa de treinamento.

No teste de intolerância à glicose, realizado pelo nosso estudo, observou-se que os animais do grupo OS tiveram significativa redução na captação de glicose quando comparados ao grupo controle. Já os ratos treinados tiveram um aumento estatístico em relação ao grupo OS, porém não foram significativos quando comparados com o grupo controle. Tais resultados mostram que o treinamento físico é capaz de melhorar a captação de glicose em ratos obesos.

Alguns autores sugerem que o exercício de alta intensidade é necessário para melhorar efetivamente o controle glicêmico (KANG et al., 1996; KANG et al., 1999). No entanto, quando o total de energia gasta é equiparado, outros autores têm falhado ao tentar provar que o exercício intenso é mais efetivo que o leve a

moderado no controle glicêmico de pacientes com DM2 (LARSEN et al., 1997; LARSEN et al., 1999).

Vale apenas destacar que embora a intensidade de exercício seja fundamental para incrementos da aptidão física, este deve ocorrer com cautela e com segurança, levando em consideração cada indivíduo. Por exemplo, Perri et. al. (2002) demonstraram uma relação inversa existente entre o treinamento de alta intensidade e a aderência dos pacientes no programa de intervenção.

Com o propósito de analisar a resposta da glicose sanguínea, em pacientes com DM2, durante e após exercício agudo de 20 minutos em bicicleta ergométrica a 90 e 110% do limiar anaeróbio (LA), Hiyane et al. (2007) comprovaram que ambas as intensidades tiveram redução significativa da glicose sanguínea. Porém o exercício de maior intensidade (110% LA) resultou em tendência de maior e mais duradouro efeito hipoglicemiante, podendo ser uma alternativa para melhor controle da glicose sanguínea em diabéticos tipo 2 que não possuam problemas cardiovasculares ou outras complicações e restrições ao exercício realizado acima do LA. Corroborando com isto, um estudo com exercício agudo em três diferentes intensidades, realizado com humanos, a captação de glicose aumentou conforme aumento da intensidade do exercício. (CHEN et al, 2003).

No entanto, apesar dos trabalhos serem diversos, quase sempre mostraram resultados satisfatórios de um programa de treinamento físico sobre a hiperglicemia. Snowling e Hopkins (2006) mostraram que um programa de exercício físico regular de intensidade moderada, auxilia no controle glicêmico do indivíduo com DM2, tratado ou não com insulina, sendo que seu efeito já é observado em uma única sessão de exercício.

Em estudo realizado com protocolo de treinamento semelhante ao nosso, Gomes et al. (2008) observaram que os grupos de diabéticos (treinado e sedentário) demonstravam elevadas concentrações de glicose e ácidos graxos livres séricos, quando comparados com os grupos controles (sedentário e treinado). Porém, notou-se que o grupo diabético treinado apresentou redução significativa dos níveis de glicose e AGL em comparação ao grupo diabético sedentário. O protocolo de treinamento físico utilizado foi eficiente em reduzir a glicemia dos animais diabéticos normalizando também as concentrações séricas de AGL's.

Num estudo comparando exercício agudo e treinamento de curto prazo, os resultados demonstraram a efetividade do treinamento de curto prazo na melhora da

captação da glicose mediada pela insulina em torno de 30% superior, em homens jovens, saudáveis e sedentários, assim como em outros estudos similares (HOUMARD et al., 1999; TANNER et al., 2002; YOUNGREN et al., 2001).

Em uma metanálise feita por Snowling e Hopkins, (2006) foi demonstrado haver estudos suficientes que nos levam a conclusão de que o treinamento aeróbio, resistido ou combinado tem efeitos de leve a moderado no controle da glicose em pacientes com DM2. Em outro estudo, liderado por Thorell et al. (1999), uma única sessão de exercício submáximo em cicloergômetro durante 60 minutos a 70% do VO_2 máx. resultou num significativo aumento de GLUT-4 na membrana plasmática do músculo esquelético humano. Esta intensidade de exercício é conhecida por aumentar a captação de glicose nos músculos esqueléticos, sugerindo que, de forma semelhante aos modelos animais, a translocação de GLUT-4 em humanos é um importante mecanismo para o aumento da captação de glicose durante o exercício físico.

Numa pesquisa onde 8 homens saudáveis realizaram treinamento de endurance com uma única perna num ciclo ergômetro, Frosig et al. (2007) demonstrou que após 15h da última sessão de exercício, a captação de glicose estimulada pela insulina era 60% maior no músculo da perna exercitado durante o período de infusão de insulina. Este aumento coincidiu com o aumento da expressão de GLUT-4 e da atividade da Akt após o treinamento. Estas adaptações parecem melhorar as condições intracelulares para captação e metabolismo de glicose. Além disso, a nível extracelular, o treinamento melhorou os efeitos hemodinâmicos da insulina, possivelmente possibilitando uma melhora na entrega da insulina e da glicose.

Já Kraniou et al. (2006) igualando o total de trabalho, realizou exercício de forma aguda em 2 grupos de pessoas, um a 40% do VO_2 pico durante 60 minutos e outro a 80% do VO_2 pico durante 27 minutos. Os resultados mostraram que houve um aumento na expressão do RNAm de GLUT-4 e da proteína GLUT-4 no músculo esquelético humano de forma similar em ambos os grupos, apesar da diferença de duração e intensidade. Esta resposta adaptativa na expressão de GLUT-4 pode contribuir para a melhora na ação da insulina e no estoque de glicogênio no período pós-exercício.

Em um treinamento aeróbio de curto prazo (7 dias), realizado com voluntários, a 75% do VO_2 pico e duração de 60 minutos, os níveis de RNAm de GLUT-4,

medidos 24h depois da primeira e da sétima sessão de exercício, foram similares aos mensurados antes de começar o treinamento. Em contraste, a expressão da proteína GLUT-4 estava maior após os 7 dias de treinamento. Estes resultados sugerem que, apesar do RNAm de GLUT-4 retornar ao nível basal entre os estímulos dos exercícios, há um aumento adaptativo da expressão da proteína GLUT-4 no músculo esquelético, devido ao repetitivo aumento na transcrição do gene de GLUT-4 após cada sessão de exercício, levando a um acúmulo gradual da proteína (KRANIOU et al., 2004). Embora não tenhamos analisado a expressão do GLUT-4 é possível que um aumento na quantidade dessa proteína tenha ocorrido com o treinamento, justificando a maior sensibilidade à insulina durante o TTI dos animais treinados em relação aos sedentários.

Quanto aos valores da insulina de jejum, os ratos do grupo OS quando comparados aos demais grupos, apresentaram valores significativamente maior. No entanto, a insulinemia não foi estatisticamente diferente entre os grupos controle, OT-1 e OT-2. Curiosamente o grupo de ratos treinados com maior intensidade obteve valores de insulina menor se comparado ao grupo de animais que treinaram sem sobrecarga alguma.

Em experimentos com humanos e animais, o treinamento de endurance melhorou a captação de glicose induzida pela insulina (ARONSON et al., 1997; HARDIN et al., 1995) e reduziu a secreção de insulina induzida pela estimulação de glicose (HELLENIOUS et al., 1995), contribuindo para a homeostase da glicose.

Esses resultados são bastante significativos, pois mostram indiretamente uma adaptação positiva do treinamento sobre a secreção de insulina nos ratos obesos (OT-2). Isso mostra que o treinamento com sobrecarga reduz a secreção de insulina, o que em longo prazo pode retardar o surgimento da diabetes. Por outro lado, os animais obesos que apresentam níveis elevados de insulinemia, podem acelerar o desenvolvimento da doença, uma vez que, existe maior produção de insulina na tentativa de vencer a resistência periférica ao hormônio.

Analisando a proteína Akt, ocorreu um aumento na fosforilação da mesma nos ratos controles que receberam injeção de insulina. Nos ratos OS, a fosforilação da Akt foi reduzida após injeção de insulina, quando comparado com os animais controles. Nos grupos OT-1 e OT-2, a fosforilação da Akt aumentou comparada aos animais do grupo OS, respectivamente, quando estimulado por insulina. Além disso, houve diferença estatística entre os grupos treinados, tendo os ratos OT-2

apresentado maior fosforilação da Akt em relação aos ratos OT-1. Entretanto, não houve diferença na expressão da Akt entre os grupos estudados. Tais resultados mostram novamente que a intensidade teve efeitos significativos para a homeostase da glicose, tendo os animais treinados com sobrecarga melhores adaptações moleculares, evidenciadas em nosso estudo através da fosforilação desta proteína.

A Akt tem sido vista como um importante alvo para mediar a ação da insulina na síntese de glicogênio, translocação de GLUT-4, transporte de glicose e regulação de genes (WHITEMAN et al., 2002). Além disso, a contração muscular do exercício físico, e a melhora na secreção e sensibilidade à insulina provocada pelo treinamento, aumentam a atividade da Akt no músculo esquelético (BRUSS et al., 2005).

Em estudo com humanos, Wadley et al. (2007), verificaram um aumento de 50% na atividade da Akt estimulada pela insulina 24h depois da primeira sessão de exercício (agudo) e após 7 dias de treinamento. O estudo mostrou que a atividade da Akt está aumentada 24h depois do fim do exercício, tanto de uma sessão aguda, quanto de uma última sessão de treinamento de curta duração.

Em acordo com resultados encontrados em nosso trabalho, recentes estudos que analisaram os efeitos do treinamento de curto prazo sobre os elementos da via de sinalização da insulina mostram que este é eficaz. Chibalin et al. (2000) encontraram um aumento da fosforilação do IRS-1 e IRS-2 e aumento da atividade da PI3q depois de apenas 5 dias de treinamento em ratos Wistar, enquanto Wojtaszewski et al. (2000) acharam um aumento na captação de glicose e na síntese de glicogênio depois de 1h de exercício agudo em humanos jovens e saudáveis.

Deshmukh et al. (2006) determinaram os efeitos do exercício de endurance e do exercício resistido na fosforilação da Akt e seus substratos em 6 ciclistas treinados que realizaram uma sessão aguda de exercício de endurance e após 7 dias, outra sessão aguda de exercício resistido. Foi encontrado que a atividade da Akt estava aumentada após o exercício de endurance, mas se manteve sem alteração após o exercício resistido. Isto pode ter ocorrido pois os sujeitos eram treinados em exercício de endurance, ou porque apenas o treinamento aeróbio é capaz de produzir melhoras no que diz respeito a essa proteína.

Há fortes evidências do aumento na fosforilação da Akt, no músculo esquelético humano de pacientes com DM2 logo após o exercício de endurance

(DESHMUKH et al., 2006; HOWLETT et al., 2006; SAKAMOTO et al., 2004; WILSON et al., 2006). Porém, alguns estudos relataram que apenas com a contração muscular, não ocorre aumento de atividade da Akt no músculo esquelético humano após este tipo de exercício (THORELL et al., 1999).

Também ocorre uma contradição semelhante nas pesquisas feitas com animais. Em ratos, estudos prévios têm sugerido que a contração isolada do músculo esquelético sem o estímulo da insulina não aumenta a atividade ou fosforilação da Akt (BROZINICK e BIMBAUM, 1998; LUND et al., 1998). Contudo, outros estudos contradizem esta informação (TURINSKY e DAMRAU-ABNEY, 1999). Estes dados demonstram que o exercício moderado e a hiperinsulinemia fisiológica aumentam a translocação de GLUT-4 e a fosforilação da Akt no músculo esquelético humano (THORELL et al., 1999).

Em ratos, após 6 semanas de treinamento durante 5 vezes por semana, houve um aumento na fosforilação da Akt estimulada pela insulina (CHIBALIN et al., 2000; LUCIANO et al., 2002). Christ-Roberts et al. (2004) observou um aumento total da proteína Akt com o treinamento em sujeitos idosos com e sem DM2. No entanto, este aumento foi revertido após período de destreinamento (KUMP e BOOTH, 2005).

Em outro estudo com protocolo de treinamento semelhante ao nosso, foi demonstrado que a fosforilação do IRS-1 e IRS-2 induzido pela insulina aumentou assim como a sua associação com a PI3K em ratos treinados comparado com os sedentários controles. A fosforilação em serina da Akt também aumentou em ratos treinados em resposta a insulina quando comparados com sedentários. Estes resultados foram acompanhados pelo aumento da captação de glicose como demonstrado no teste de tolerância à insulina (TTI), assim como em nosso estudo, e pelo aumento da expressão de GLUT-4, que apesar de não ter sido mensurado em nossa pesquisa, pode-se dizer que devido aos resultados apresentados, que também houve aumento (LUCIANO et al., 2002).

Tais estudos supracitados estão de acordo com resultados encontrados em nosso trabalho. Embora existam diferenças entre os protocolos de exercícios, quase todos os trabalhos mostram que o exercício físico é eficaz em aumentar a captação de glicose no músculo, e que em parte, o aumento desta captação esta relacionada a maior atividade da Akt. Em consequência disto, ocorre uma melhora da captação

de glicose no músculo esquelético (principal tecido responsável pelo consumo desta hexose), e com isso tem-se uma diminuição da glicemia e insulinemia.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo mostrou que, apesar do treinamento físico aeróbio ser um importante agente na melhora de componentes morfológicos (peso e gordura corporal), fisiológicos (glicemia de jejum, insulina de jejum) e bioquímicos (captação de glicose e expressão da proteína Akt) de ratos diabéticos, a intensidade em que é realizado um programa de treinamento deve ser levada em consideração. Foi demonstrado que no exercício físico aeróbio, realizado de maneira crônica em intensidades mais altas, ocorreram melhores respostas adaptativas ao treinamento e à via de sinalização da insulina, demonstrando ser uma ferramenta mais efetiva na prevenção e tratamento do diabetes mellitus tipo 2.

9. REFERÊNCIAS

- ARONSON, D.; VIOLAN, M. A.; DUFRESNE, S. D.; et al. Exercise stimulates the mitogen-activated protein kinase pathway in human skeletal muscle. **Journal of Clinical Investigation**, v.99, p.1251-1257, 1997.
- BJORNTORP, P.; DE JOUNGE, K.; SJOSTROM, L.; et al. The effect of physical training on insulin production in obesity. **Metabolism**, v.19, n.8, p.631-638, 1970.
- BJORNTORP, P.; FAHLEN, M.; GRIMBY, G.; et al. Carbohydrate and lipid metabolism in middle-aged, physically well-trained men. **Metabolism**, v.21, n.11, p.1037-1104, 1972.
- BOOTH, F. W.; LAYE, M. J.; LEES, S. J.; et al. Reduced physical activity and risk of chronic disease: the biology behind the consequences. **European Journal of Applied Physiology**, v.102, p.381-390, 2008.
- BOOTH, F.W.; GORDON, S. E.; CARLSON, C. J.; et al. Waging war on modern chronic diseases: primary prevention through exercise biology. **Journal Applied of Physiology**, v.88, p.774-787, 2000.
- BOULÉ, N. G.; KENNY, G. P.; HADDAD, E.; et al. Meta-analysis of the effect of structured exercise training on cardiorespiratory fitness in type 2 diabetes mellitus. **Diabetologia**, v.46, p.1071-1081, 2003.
- BOULÉ, N. G.; WEISNAGEL, S. J.; LAKKA, T. A.; et al. Effects of exercise training on glucose homeostasis. **Diabetes Care**, v.28, p.108-114, 2005.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Sistema de monitoramento de fatores de risco e proteção para doenças crônicas não transmissíveis**. Brasília, 2007. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=29793&janela=1>. Acesso em: 20 set. 2009.
- BROZINICK Jr, J. T.; BIRNBAUM, M. J. Insulin, but not contraction, activates Akt/PKB in isolated rat skeletal muscle. **The Journal of Biological Chemistry**, v.273, p.14679-14682, 1998.
- BRUSS, M. D.; ARIAS, E. B.; LIENHARD, G. E.; et al. Increased phosphorylation of Akt substrate of 160 kDa (AS169) in rat skeletal muscle in response to insulin or contractile activity. **Diabetes**, v.54, p.41-50, 2005.
- CHEN, Z. P.; STEPHENS, T. J.; MURTHY, S. et al. Effect of exercise intensity on skeletal muscle AMPK signaling in humans. **Diabetes**, v.52, p.2205-2212, 2003.

CHIBALIN, A. V.; YU, M.; RYDER, J. W.; et al. Exercise-induced changes in expression and activity of proteins involved in insulin signal transduction in skeletal muscle: differential effects on insulin-receptor substrates 1 and 2. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, v.97, p.38-43, 2000.

CHRIST-ROBERTS, C. Y.; PRATIPANAWATR, T.; PRATIPANAWATR, W. Exercise training increases glycogen synthase activity and GLUT4 expression but not insulin signaling in overweight nondiabetic and type 2 diabetic subjects. **Metabolism**, v.53. p.1233-1242, 2004.

CODERRE, L.; KANDROR, K. V.; VALLEGA, G.; et al. Identification and characterization of an exercisesensitive pool of glucose transporters in skeletal muscle. **The Journal of Biological and Chemistry**, v.270, n.46, p.27584- 27588, 1995.

DANDONA, P.; ALJADA, A.; BANDYOPADHYAY, A. Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. **Trends in immunology**, v.25, p.4-7, 2004.

DESHMUKH, A.; COFFEY, V. G.; ZHONG, Z.; et al. Exercise-induced phosphorylation of the novel Akt substrates AS160 and filamin A in human skeletal muscle. **Diabetes**, v.55, p.1776-1782, 2006.

DOUEN, A. G.; RAMLAL, T.; RASTOGI, S.; et al. Exercise induces recruitment of the "insulin-responsive glucose transporter". Evidence for distinct intracellular insulin- and exercise-recruitable transporter pools in skeletal muscle. **The Journal of Biological and Chemistry**, v.265, n.23, p.13427-13430, 1990.

DWYER, T.; MAGNUSSEN, C. G.; SCHMIDT, M. D.; et al. Decline in physical fitness from childhood to adulthood associated with increased obesity and insulin resistance in adults. **Diabetes Care**, v.32, p. 683–687, 2009.

FISCHER, C. P.; BERNTSEN, A.; PERSTRUP, L. B.; et al. Plasma levels of interleukin-6 and C-reactive protein are associated with physical inactivity independent of obesity. **Scandinavian Journal of Medicine & Science Sports**, v.5, p.580-587, 2007.

FOSTER, L. J.; KLIP, A. Mechanism and regulation of GLUT-4 vesicle fusion in muscle and fat cells. **American Journal of Cellular Physiology**, v.279, n.4, p.C877-C890, 2000.

FROSIG, C.; ROSE, A. J.; TREEBAK, J. T. Effects of endurance exercise training on insulin signaling in human skeletal muscle: interactions at the level of phosphatidylinositol 3-kinase, Akt, and AS160. **Diabetes**, v.56, p.2093-2102, 2007.

GOMES, R.J., et al. Efeitos do treinamento de natação em aspectos metabólicos e morfológicos de ratos diabéticos. **Motriz**, Rio Claro, v.14, n.3, p.320-328, 2008.

GOODYEAR, L. J.; KAHN, B. B. Exercise, glucose transport, and insulin sensitivity. **Annual Review of Medicine**, v.49, p.235-261, 1998.

HANDSCHIN, C.; SPIEGELMAN, B. M. The role of exercise and PGC1 in inflammation and chronic disease. **Nature**, v.454, p.463-469, 2008.

HANSEN, D.; DENDALE, P.; JONKERS, R. A. M.; et al. Continuous low- to moderate-intensity exercise training is as effective as moderate- to high-intensity exercise training at lowering blood HbA1c in obese type 2 diabetes patients. **Diabetologia**, v.52, p.1798-1797, 2009.

HARDIE, D. G.; CARLING, D. The AMP-activated protein kinase: fuel gauge of the mammalian cell? **European Journal of Biochemistry**, v.246, n.2, p.259-273, 1997.

HARDIN, D. S.; AZZARELLI, B.; EDWARDS, J.; et al. Mechanisms of enhanced insulin sensitivity in endurance-trained athletes: effects on blood flow and differential expression of GLUT 4 in skeletal muscles. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.80, p.2437-2446, 1995.

HAWLEY, J. A. Exercise as a therapeutic intervention for the prevention and treatment of insulin resistance. **Diabetes Metabolism Research and Reviews**, v.20, n.15, p.383-393, 2004.

HAWLEY, J. A.; LESSARD, S. J. Exercise training-induced improvements in insulin action. **Acta Physiologica Oxford**, v.192, p.127-135, 2008.

HAYASHI, T.; WOJTASZEWSKI, J. F.; GOODYEAR, L. J. Exercise regulation of glucose transport in skeletal muscle. **American Journal of Physiology**, v.273, n.6 Pt 1, p.E1039-1051, 1997.

HELLENIOUS, M. L. B.; BRISMAR, K. E.; BERGLUND, B. H.; et al. Effects on glucose tolerance, insulin secretion, insulin-like growth factor 1 and its binding protein, IGFBP-1, in a randomized controlled diet and exercise study in healthy, middle-aged men. **Journal of Internal Medicine**, v.238, p.121-130, 1995.

HENRIKSEN, E. J. Invited review: Effects of acute exercise and exercise training on insulin resistance. **Journal Applied of Physiology**, v.93, n.2, p.788-796, 2002.

HIROSUMI, J. et al. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. **Nature**, v.420, p.353-356, 2002.

HIYANE, W.C. et al. Blood glucose responses of type-2 diabetics during and after exercise performed at intensities above and below anaerobic threshold. **Revista Brasileira de Cineantropometria & Desempenho Humano**, v.10, n.1, p.8-11, 2008.

HOSSAIN, P.; KAWAR, B.; EL NAHAS, M. Obesity and diabetes in the development world: a growing challenge. **The New England Journal of Medicine**, 356: 213-215, 2007.

HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammatory pathways and insulin action. **International Journal of Obesity Related Metabolism Disorder**, v.27, p.S53-S55, 2003.

HOTAMISLIGIL, G. S.; PERALDI P, B.; ELLIS, R., et al. IRS-1 mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha and obesity-induced insulin resistance. **Science**, v. 271(5249), p.665-668, 1996.

HOUMARD, J, A.; SHAW, C. D.; HICKEY, M. S.; et al. Effect of short-term exercise training on insulin-stimulated PI 3-kinase activity in human skeletal muscle. **American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism**, v.277, p.E1055-E1060, 1999.

HOWLETT, K. F.; SAKAMOTO, K.; HIRSHMAN, M. F.; et al. Insulin signaling after exercise in insulin receptor substrate-2-deficient mice. **Diabetes**, v.51, n.2, p.479-483, 2002.

HOWLETT, K.F.; SAKAMOTO, K.; YU, H.; et al. Insulin stimulated insulin receptor substrate-2-associated phosphatidylinositol 3 kinase activity is enhanced in human skeletal muscle after exercise. **Metabolism**, v.55, p.1046-1052, 2006.

JAKICIC, J. M.; MARCUS, B. H.; GALLAGHER, K. I.; et al. Effect of exercise duration and intensity on weight loss in overweight, sedentary women. A randomized trial. **The Journal of the American Medical Association**, v.290, p.1323-1330, 2003.

JÖNSSON, B. Revealing the cost of type II diabetes in Europe. **Diabetologia**, v.45, p.S5–S12, 2002.

KANG, J.; KELLEY, D. E.; ROBERTSON, R. J.; et al. Substrate utilization and glucose turnover during exercise of varying intensities in individuals with NIDDM. **Medicine & Science in Sports and Exercise**, v.31, p.82-89, 1999.

KANG, J.; ROBERTSON, R. J.; HAGBERG, J. M.; et al. Effect of exercise intensity on glucose and insulin metabolism in obese individuals and obese NIDDM patients. **Diabetes Care**, v.19, p.341-349, 1996.

KING, H.; AUBERT, R. E.; HERMAN, W. H. Global burden of diabetes, 1995-2025. **Diabetes Care**, v.21. p.1414-1431, 1998.

KNOWLER, W. C.; BARRETT-CONNOR, E.; FOWLER, S. E.; et al. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. **New England Journal of Medicine**, v.346, n.6, p.393-403, 2002.

KOHL, H. W.; GORDON, N.F.; VILLEGAS, J. A.; et al Cardiorespiratory fitness, glycemic status, and mortality risk in men. **Diabetes Care**, v.15, p.184–192, 1992.

KRANIOU, G. N.; CAMERON-SMITH, D.; HARGREAVES, M. Acute exercise and GLUT4 expression in human skeletal muscle: influence of exercise intensity. **Journal Applied of Physiology**, v.101, p.934–937, 2006.

KRANIOU, G.; CAMERON-SMITH, D.; HARGREAVES, M. Effect of short-term training on GLUT-4 mRNA and protein expression in human skeletal muscle. **Experimental Physiology**, v.89, p.559–563, 2004.

KUMP, D. S.; BOOTH, F. W. Alterations in insulin receptor signalling in the rat epitrochlearis muscle upon cessation of voluntary exercise. **Journal of Physiology**, v.562, p.829-838, 2005.

LARSEN, J. J. S.; DELA, F.; KJAER, M.; et al. The effect of moderate exercise on postprandial glucose homeostasis in NIDDM patients. **Diabetologia**, v.40, p.447-453, 1997.

LARSEN, J. J. S.; DELA, F.; MADSBAD, S.; et al. The effect of intense exercise on postprandial glucose homeostasis in Type II diabetic patients. **Diabetologia**, v.42, p.1282-1292, 1999.

LUCIANO, E.; CARNEIRO, E. M.; CARVALHO, C. R.; et al. Endurance training improves responsiveness to insulin and modulates insulin signal transduction through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-1 pathway. **European Journal of Endocrinology**, v.147, p.149-157, 2002.

LUND, S.; PRYOR, P. R.; OSTERGAARD, S.; et al. Evidence against protein kinase B as a mediator of contraction-induced glucose transport and GLUT4 translocation in rat skeletal muscle. **FEBS Letters**, v.425, p.472-474, 1998.

MILANSKI, M.; DEGASPERI, G.; COOPE, A.; et al. Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. **The Journal of Neuroscience**, v.29, n.2, p.359-370, 2009.

MISRA, A.; KHURANA, L. Obesity and the metabolic syndrome in developing countries. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.93, p.S9-S30, 2008.

MONDON, C. E.; DOLKAS, C. B.; REAVEN, G. M. Site of enhanced insulin sensitivity in exercise-trained rats at rest. **American Journal of Physiology**, v.239, n.3, p.E169-177, 1980.

OLIVEIRA, C. L.; MELLO, M. T.; CINTRA, I. P.; et al. Obesidade e síndrome metabólica na infância e adolescência. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.17, n.2, 2004.

PAULI, J. R.; CINTRA, D. E.; SOUZA, C. T.; et al. Novos mecanismos pelos quais o exercício físico melhora a resistência à insulina no músculo esquelético. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, São Paulo, v.53, n.4, 2009.

PAULI, J. R.; ROPELLE, E. R.; CINTRA, D. E.; et al. Acute physical exercise reverses S-nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1, and protein kinase B/Akt in dietary induce obese Wistar rats. **The Journal of Physiology**, v. 586, p.659-671, 2008.

PERRI, M. G.; ANTON, S. D.; DURNING, P.E. et al. Adherence to exercise prescriptions: effects of prescribing moderate vs higher levels of intensity and frequency. **Health Psychology**, v.21, p.452–458, 2002.

PETERSEN, A. M.; PEDERSEN, B. K. The anti-inflammatory effect of exercise. **Journal Applied of Physiology**, v.98, p.1154-62, 2005.

ROBERTS, C.K.; BARNARD, R. J.; JASMAN, A.; et al. Acute exercise increases nitric oxide synthase activity in skeletal muscle. **American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism**, v.277 (2 Pt 1), p.E390-394, 1999.

ROPELLE, E. R.; PAULI, J. R.; PRADA, P. O.; et al. Reversal of diet-induced insulin resistance with single bout of exercise in the rat the role of PTP1B and IRS-1 serine phosphorylation. **The Journal of Physiology**, v.577, p.997-1007, 2007.

SAKAMOTO, K.; ARNOLDS, D. E.; EKBERG, I.; et al. Exercise regulates Akt and glycogen synthase kinase-3 activities in human skeletal muscle. **Biochemical Biophysical Research Communications**, v.319, p419-425, 2004.

SALTIEL, A. R.; KAHN, C.R. Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, v.414, p.799-806, 2001.

SAVAGE, D.B.; PETERSEN, K. F.; SHULMAN, G. I. Disordered lipid metabolism and the pathogenesis of insulin resistance. **Physiological Reviews**, v.87, n.2, p.507-520, 2007.

SHOELSON, S. E.; LEE, J.; YUAN, M. Inflammation and the IKK beta/I kappa N/NF-kappa B axis in obesity- and diet-induced insulin resistance. **The Journal of Clinical Investigation**, v.106, p.171-176, 2003.

SHULMAN, G.I. Cellular mechanisms of insulin resistance. **The Journal of Clinical Investigation**, v.106, p.171-176, 2000.

SHULMAN, G.I. Unraveling the cellular mechanism of insulin resistance in humans: new insights from magnetic resonance spectroscopy. **Physiology**, v.19, p.183-190, 2004.

SILVA da, C. A.; LIMA de, W. C. Efeito Benéfico do Exercício Físico no Controle Metabólico do Diabetes Mellitus Tipo 2 à Curto Prazo. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, São Paulo, v.46, n.5, 2002.

SIMONEAU, J. A.; VEERKAMP, J. H.; TURCOTTE, L. P.; et al. Markers of capacity to utilize fatty acids in human skeletal muscle: relation to insulin resistance and obesity and effects of weight loss. **FASEB J**, v.13, p.2051- 2060, 1999.

SLENTZ, C. A.; DUSCHA, B. D.; JOHNSON, J. L.; et al. Effects of the amount of exercise on body weight, body composition, and measures of central obesity: STRIDE: a randomized controlled study. **Archives of Internal Medicine**, v.164, p.31–39, 2004.

SNOWLING, N. J.; HOPKINS, W. G. Effects of different modes of exercise training on glucose control and risk factors for complications in type 2 diabetic patients: a meta-analysis. **Diabetes Care**, v.29, p.2518–2527, 2006.

SRIWIJITKAMOL, A.; COLETTA, D. K.; WAJCBURG, E.; et al. Effect of acute exercise on AMPK signaling in skeletal muscle of subjects with type 2 diabetes: a time-course and dose-response study. **Diabetes**, v.3, p.836-848, 2007.

TANNER, C. J.; KOVES, T. R.; CORTRIGHT, R. L.; et al. Effect of short-term exercise training on insulin-stimulated PI 3-kinase activity in middle-aged men. **American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism**, v.282, p.E147-E153, 2002.

THORELL, A.; HIRSHMAN, M. F.; NYGREN, J.; et al. Exercise and insulin cause GLUT-4 translocation in human skeletal muscle. **American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism**, v.277, p.E733-E741, 1999.

TSUKUMO, D. M.; CARVALHO-FILHO, M. A.; CARVALHEIRA, J. B.; et al. Loss-of-function mutation in toll-like receptor 4 prevents diet-induced and insulin resistance. **Diabetes**, v.56, p.1986-1998, 2004.

TUOMILEHTO, J.; LINDSTROM, J.; ERIKSSON, J. G.; et al. Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. **New England Journal of Medicine**, v.344, p.1343-1350, 2001.

TURINSKY, J.; DAMRAU-ABNEY, A. Akt kinases and 2-deoxyglucose uptake in rat skeletal muscles in vivo: study with insulin and exercise. **American Journal of Physiology**, v.276, p.R277–R282, 1999.

VANCEA, D. M. M.; et al . Efeito da frequência do exercício físico no controle glicêmico e composição corporal de diabéticos tipo 2. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v.92, n.1, 2009.

WADLEY, G. D.; KONSTANTOPOULOS, N.; MACAULAY, L.; et al. Increased insulin-stimulated Akt pSer473 and cytosolic SHP2 protein abundance in human skeletal muscle following acute exercise and short-term training. **Journal of Applied Physiology**, v.102, p.1624 -1631, 2007.

WAKI, H.; TONTONNOZ, P. Endocrine functions of adipose tissue. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v.2, p.31-56, 2007.

WEI, M.; GIBBONS, L. W.; KAMPERT, J.B.; et al. Low cardiorespiratory fitness and physical inactivity as predictors of mortality in men with type 2 diabetes. **Annals of International Medicine**, v.132, p.605–611, 2000.

WHITE, M. F. The IRS-signalling system: a network of docking proteins that mediate insulin action. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.182, p.3-11, 1998.

WHITEMAN, E. L.; CHO, H.; BIRNBAUM, M. J. Role of Akt/protein kinase B in metabolism. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v.13, p.444-451, 2002.

WILSON, C.; HARGREAVES, M.; HOWLETT, K. F. Exercise does not alter subcellular localization, but increases phosphorylation of insulin-signaling proteins in human skeletal muscle. **American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism**, v.290, p.E341-E346, 2006.

WOJTASZEWSKI, J. F.; HANSEN, B. F.; GADE, J.; et al. Insulin signaling and insulin sensitivity after exercise in human skeletal muscle. **Diabetes**, v.49, p.325–331, 2000.

WOJTASZEWSKI, J. F.; HIGAKI, Y.; HIRSHMAN, M. F.; et al. Exercise modulates post receptor insulin signaling and glucose transport in muscle-specific insulin receptor knockout mice. **The Journal of Clinical Investigation**, v.104, n.9, p.1257-1264, 1999.

XU, H.; BARNES, G. T.; YANG, Q.; et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. **The Journal of Clinical Investigation**, v.112, p.1821-1830, 2003.

YOUN, J. H.; GULVE, E. A.; HOLLOSZY, J. O. Calcium stimulates glucose transport in skeletal muscle by a pathway independent of contraction. **American Journal of Cellular Physiology**, v.260, p.555-561, 1991.

YOUNGREN, J. F.; KEEN, S.; KULP, J. L.; et al. Enhanced muscle insulin receptor autophosphorylation with shortterm aerobic exercise training. **American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism**, v.280, p.E528-E533, 2001.

ZIMMET, P.; ALBERTI, K. G.; SHAW, J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. **Nature**, n.414, p.782–787, 2001.